

Séance génome : Explication PCR, électrophorèse et méthodes de séquençage

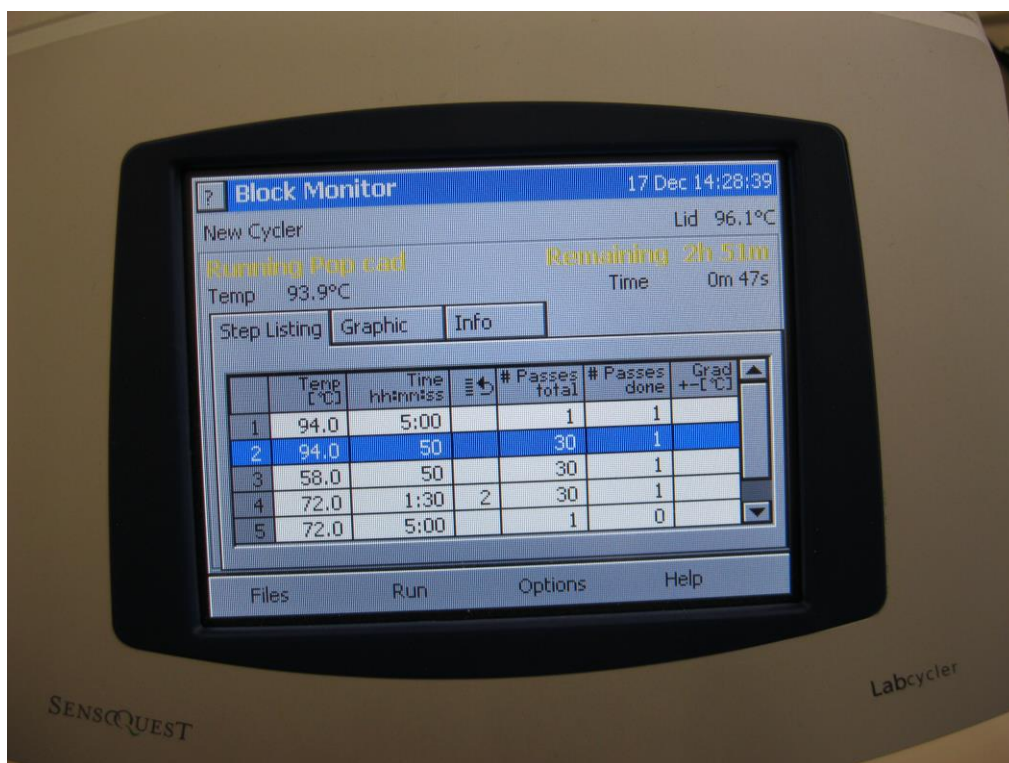
La PCR (Polymérase Chain Reaction) est une technique qui permet de démultiplier en de très nombreuses quantités une séquence de nucléotides parmi l'ensemble de la molécule d'ADN. Comment cela fonctionne-t-il et comment la réaliser ?

Protocole pour réaliser une PCR :

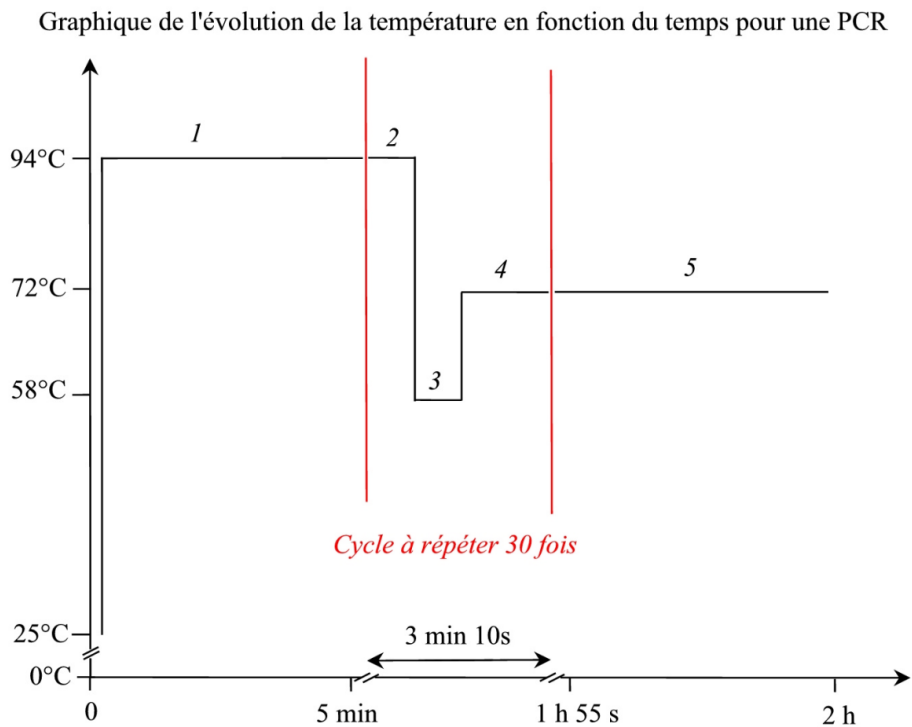
- Dans un tube PCR, introduire 0.5µl de l'amorce 1 ; 0.5 µl de l'amorce 2 ; 12 µl d'eau ppi ; 15 µl de GREEN TAq et, à la fin, 2 µl de solution d'ADN extrait précédemment.
- Agiter doucement pour ne pas abimer l'ADN.
- Déposer le tube dans son compartiment à l'intérieur du séquenceur.
- Programmer et lancer le séquenceur sur le programme « pop_CAD » de la manière suivante :

Étape	Nom de l'étape	Température	Temps	Nombre de cycles	
1	Dénaturation initiale	94°C	5 min	1	
Cycles					
2	Dénaturation	94°C	50 sec	30	
3	Hybridation	58°C	50 sec	30	
4	Elongation	72°C	1 min 30 sec	30	
Retour à l'étape 2 tant que les 30 cycles n'auront pas été effectués.					
5	Elongation finale	72°C	5 min	1	
6	Refroidissement	12°C	1 heure	1	Facultatif

Interface du séquenceur



Allure d'un cycle de PCR :



Explication des étapes :

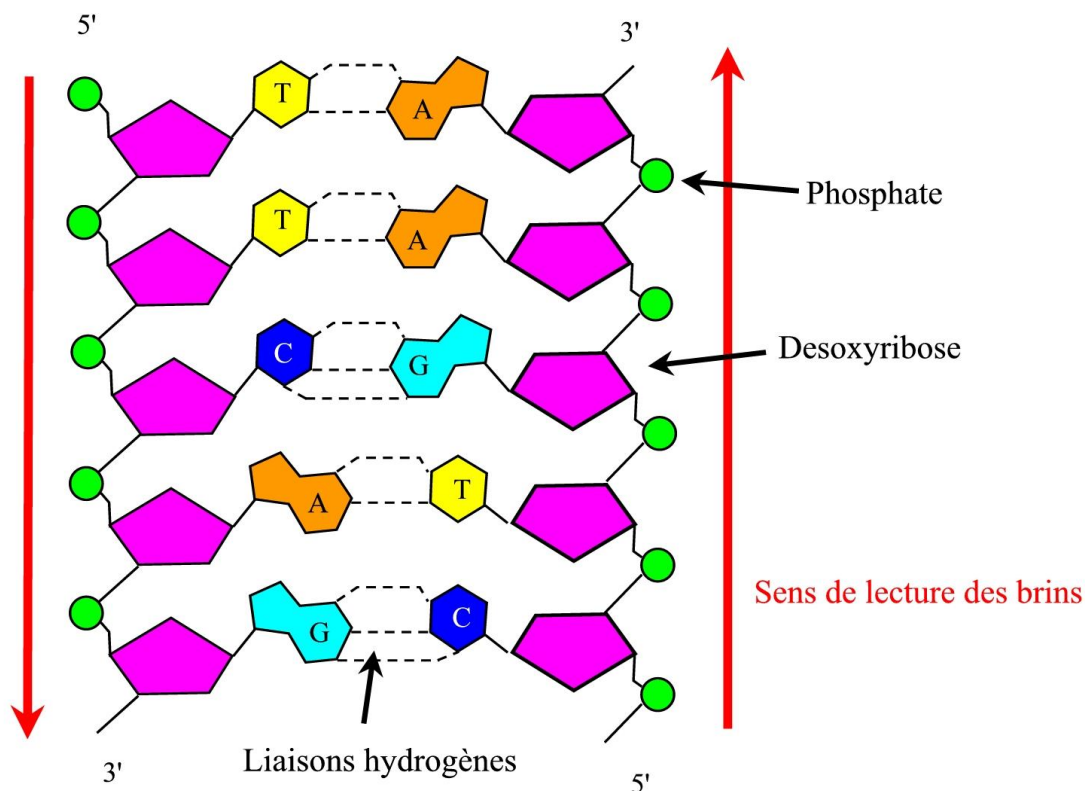
- Dénaturation de l'ADN : la dénaturation correspond à la séparation des 2 brins d'ADN ; les liaisons hydrogènes qui lient le brin 5' au brin 3' de la molécule d'ADN se rompent (= la molécule d'ADN s'ouvre en 2). La rupture des liaisons hydrogènes nécessite une quantité d'énergie considérable, d'où la température de 94°C
- Hybridation de l'ADN : l'hybridation consiste en la fixation des amorces sur la molécule d'ADN séparée. Pour cela, la température doit être plus basse de manière à permettre une quelconque fixation (si on ne diminuait pas la température, les amorces de pourraient pas se fixer et si on diminue trop la température, les liaisons hydrogènes entre les 2 brins d'ADN se reformeront).
- Elongation de l'ADN : Une fois que les amorces sont fixées, l'enzyme polymérase** (GREEN TAq) va permettre la synthèse dans le sens 5' => 3' du brin complémentaire au brin d'ADN. Après l'élongation, 2 molécules d'ADN seront alors formées.

** : Cette enzyme polymérase est une ADN polymérase particulière. En effet, dans notre corps, l'ADN polymérase est habituée à travailler sous une température de 37°. Or, durant la PCR, la température imposée à cette enzyme est de 72°. L'enzyme polymérase utilisée pour la PCR n'est donc pas une ADN polymérase humaine mais une ADN polymérase thermostable provenant d'une bactérie extrémophile et thermophile (genre *archaea*), vivant sous des températures de l'ordre de 70°-80° (Cette bactérie a été découverte par des scientifiques au niveau de sources hydrothermales ou d'eau chaude volcanique).

Explication de la fixation des amorces et de la synthèse du brin complémentaire et du fonctionnement de la PCR.

Tout d'abord, il faut savoir que la molécule d'ADN possède 2 brins, qui sont le complémentaire l'un pour l'autre selon la règle C≡G (3 liaisons H) ; A=T (2 liaisons H). Ces 2 brins possèdent également une autre distinction qui est leur sens de lecture. En effet, chaque brin d'ADN possède une extrémité 3' et une extrémité 5' qui sont inversées d'un brin à l'autre. Le sens de lecture d'un brin se fait toujours de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

Schéma d'une molécule d'ADN



Réalisation : Rémy DORNIER

Ce sens de lecture est dû à la molécule de désoxyribose, que possède la molécule d'ADN. En effet, le désoxyribose possède 5 atomes de carbone. Sur les carbones 3 et 5 se fixent les groupes phosphates. L'extrémité 5' correspond à l'extrémité de la chaîne terminée par un groupe phosphate (c'est-à-dire si le désoxyribose est lié à 2 phosphates) et l'extrémité 3' à celle terminée par un désoxyribose (c'est-à-dire si le désoxyribose est lié à un seul phosphate).

Maintenant que nous savons comment la molécule d'ADN se lit, nous allons pouvoir comprendre de quelle manière les amorces agissent sur la molécule. Prenons un exemple simple. **(ATTENTION : les amorces utilisées sont très simplistes ; les amorces réelles possédant entre 8 et 10 nucléotides. Les amorces ci-dessous permettent uniquement d'améliorer la compréhension)**

Amorce 1 : 3' TT 5'

Amorce 2 : 5' CG 3'

Séquence d'ADN : 5' ATATCC**CGATGCAACT** 3'
 3' TATAGGG**GCTACGTTGA** 5'

La séquence a amplifiée, appelée amplicon, est en rouge dans les molécules d'ADN

Commençons le premier cycle PCR :

- Etape 1 : Dénaturation : notre molécule d'ADN s'ouvre en 2

5' ATATCC**CGATGCAACT** 3'

3' TATAGGG**GCTACGTTGA** 5'

- Etape 2 : Hybridation : les amorces 1 et 2 vont venir se fixer chacune sur leur brin d'ADN respectif (amorce 1 en 3'/5' va se fixer sur le brin en 5'/3' et l'amorce 2 en 5'/3' va venir se fixer sur le brin en 3'/5'. De cette façon, la complémentarité de la molécule d'ADN est respectée)
(ATTENTION : une amorce en 3'/5' ne pourra jamais se fixer sur un brin d'ADN en 3'/5' et inversement)

5' ATATCC**CGATGCAACT** 3'

3' **TT** 5'

5' **CG** 3'

3' TATAGGG**GCTACGTTGA** 5'

- Etape 3 : Elongation : les bases azotées vont venir compléter, dans le sens 5' => 3', le brin complémentaire.

5' ATATCC**CGATGCAACT** 3'

3' TATAGGG**GCTACGTT** 5'

5' **CGATGCAACT** 3'
3' TATAGGG**GCTACGTTGA** 5'

Séquence utilisée pour
le cycle suivant

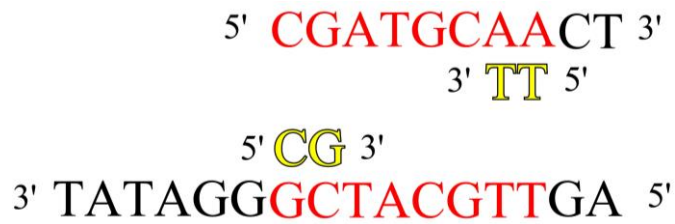
Maintenant que le 1^{er} cycle est terminé, entamons le 2^{eme} cycle. De manière à ce que l'explication soit plus compréhensible, à la fin de chaque cycle, nous ne prendrons qu'une des 2 molécules d'ADN formées, qui sera signalée par un rectangle violet.

- Etape 1 : Dénaturation

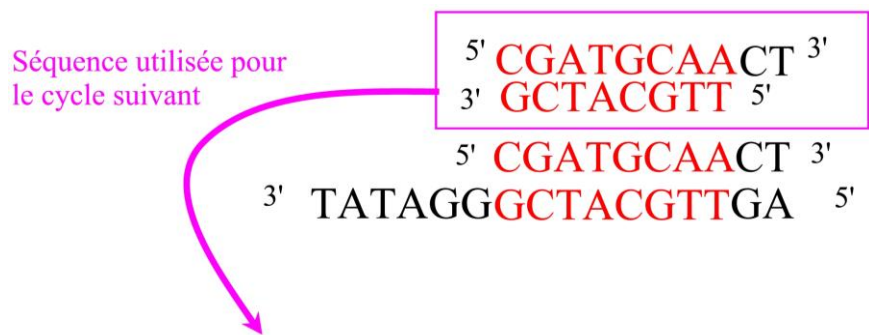
5' **CGATGCAACT** 3'

3' TATAGGG**GCTACGTTGA** 5'

- Etape 2 : Hybridation



- Etape 3 : Elongation



Le deuxième cycle est terminé, passons au troisième cycle.

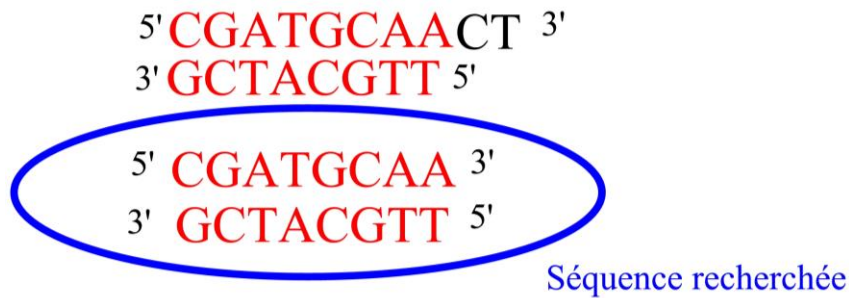
- Etape 1 : Dénaturation



- Etape 2 : Hybridation



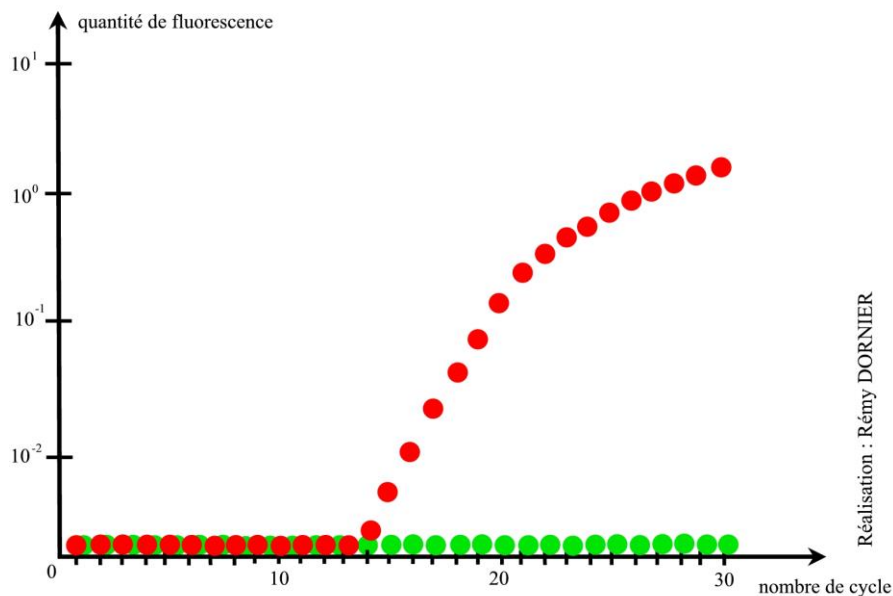
- Etape 3 : Elongation



Ce n'est qu'au bout du troisième cycle que la séquence d'ADN recherchée apparaît. Les cycles suivants vont alors permettre de démultiplier cette séquence. Le nombre de 30 cycles est un nombre suffisant pour que cette séquence soit majoritaire dans le tube PCR et pour que les chances de prélèvements de cette même séquence soient proches de 90 %. En effet, la quantité d'ADN à la fin de n cycles est de 2^n molécules. (Pour 30 cycles, \approx 1 milliard de copies).

Voilà donc élucidé le principe de la PCR.

Anecdote et ouverture: La PCR présentée ci-dessus est appelée « PCR classique » au sens où, on place tous les réactifs dans un même tube et on récupère les produits au bout de plusieurs heures de travail. Il faut savoir qu'il existe d'autres types de PCR (**ATTENTION : le mécanisme présenté ci-dessus reste toujours valable**) par exemple la PCR en temps réel. Elle permet de suivre l'évolution de la quantité d'ADN dans chaque tube cycle par cycle. Cette PCR est basée sur l'utilisation de molécules fluorescentes qui s'incorporent à l'ADN. Plus il y a d'ADN, plus la « quantité » de fluorescence augmente, ce qui nous permet de contrôler que la PCR fonctionne bien pour un gène donné. Dans ce cas précis, l'électrophorèse n'est pas nécessaire (voir ci-dessous). Autre exemple : la PCR digitale, utilisée pour quantifier l'ADN et qui utilise des micro-puits (300 μ m de diamètre) ou des gouttes.



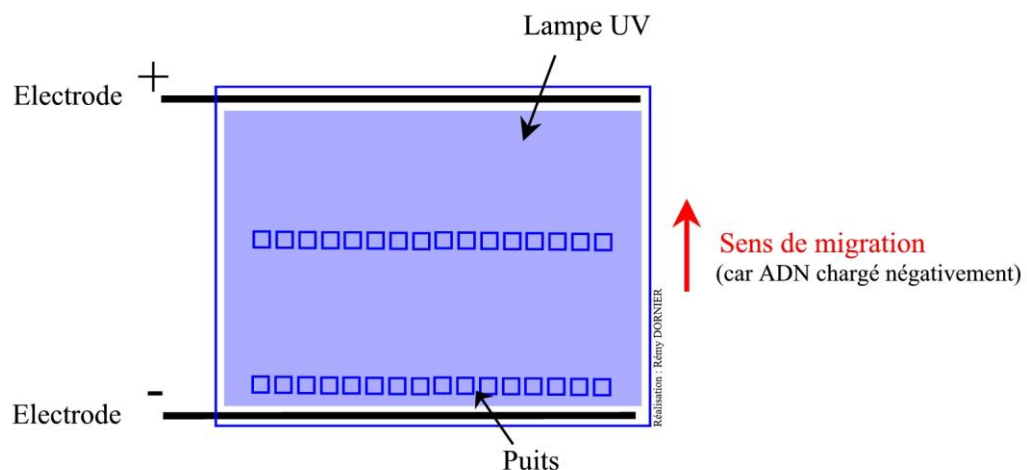
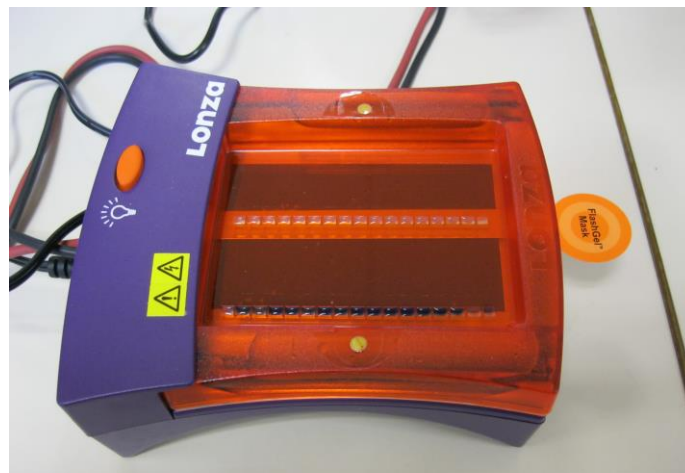
Graphique montrant l'évolution de la fluorescence (=quantité d'ADN) en fonction du nombre de cycle de PCR

Sur ce graphique, on étudie 2 tubes en PCR en temps réel. Des molécules fluorescentes ont été introduites dans les 2 tubes PCR et elles ont la particularité de se lier à la séquence d'ADN étudiée et de ne s'activer QUE si elles sont liées. Dans le tube rouge, on voit nettement que la fluorescence augmente à partir de 14 cycles (le fait est que la fluorescence n'est pas détectable en-dessous de 14 cycles pour une certaine concentration d'ADN au départ). Cela signifie que le gène étudié a été amplifié et se fait amplifier (car, plus le nombre de copie du gène est grand, plus le nombre de molécules fluorescentes activées augmente). De ce fait, on en déduit que la PCR pour ce gène fonctionne. Par contre, dans le tube vert, il n'y a aucune évolution de la fluorescence, ce qui peut signifier 2 choses : soit il n'y a pas d'ADN dans le tube et/ou pas les bons réactifs ; soit le gène amplifié n'est pas celui étudié.

Lorsque les 30 cycles sont effectués, il reste ensuite à vérifier que la séquence d'ADN voulue ait bien été multipliée si ADN il y avait dans le tube. Pour cela, nous allons réaliser une électrophorèse.

L'électrophorèse consiste en la migration de la séquence d'ADN sur un gel d'agarose entre 2 électrodes en fonction de sa masse molaire molécule. En effet, plus les séquences d'ADN sont longues, plus elles sont lourdes et plus elles vont migrer lentement. Cette technique permet de savoir si, après une PCR, la séquence d'ADN multipliée correspond bien à celle recherchée. La tâche laissée par le front de progression sera alors comparée aux tâches témoins de différentes séquences d'ADN sous une lampe UV (seul moyen de pouvoir observer le résultat).

Photo et schéma d'une cassette à électrophorèse (2 plateaux)

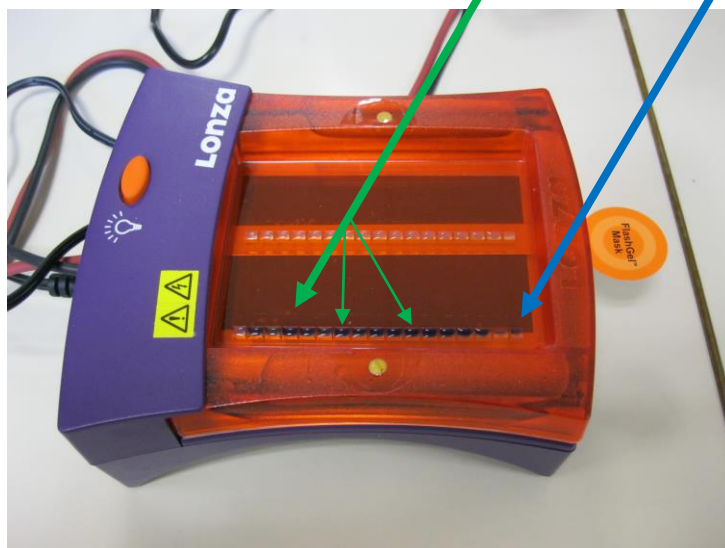
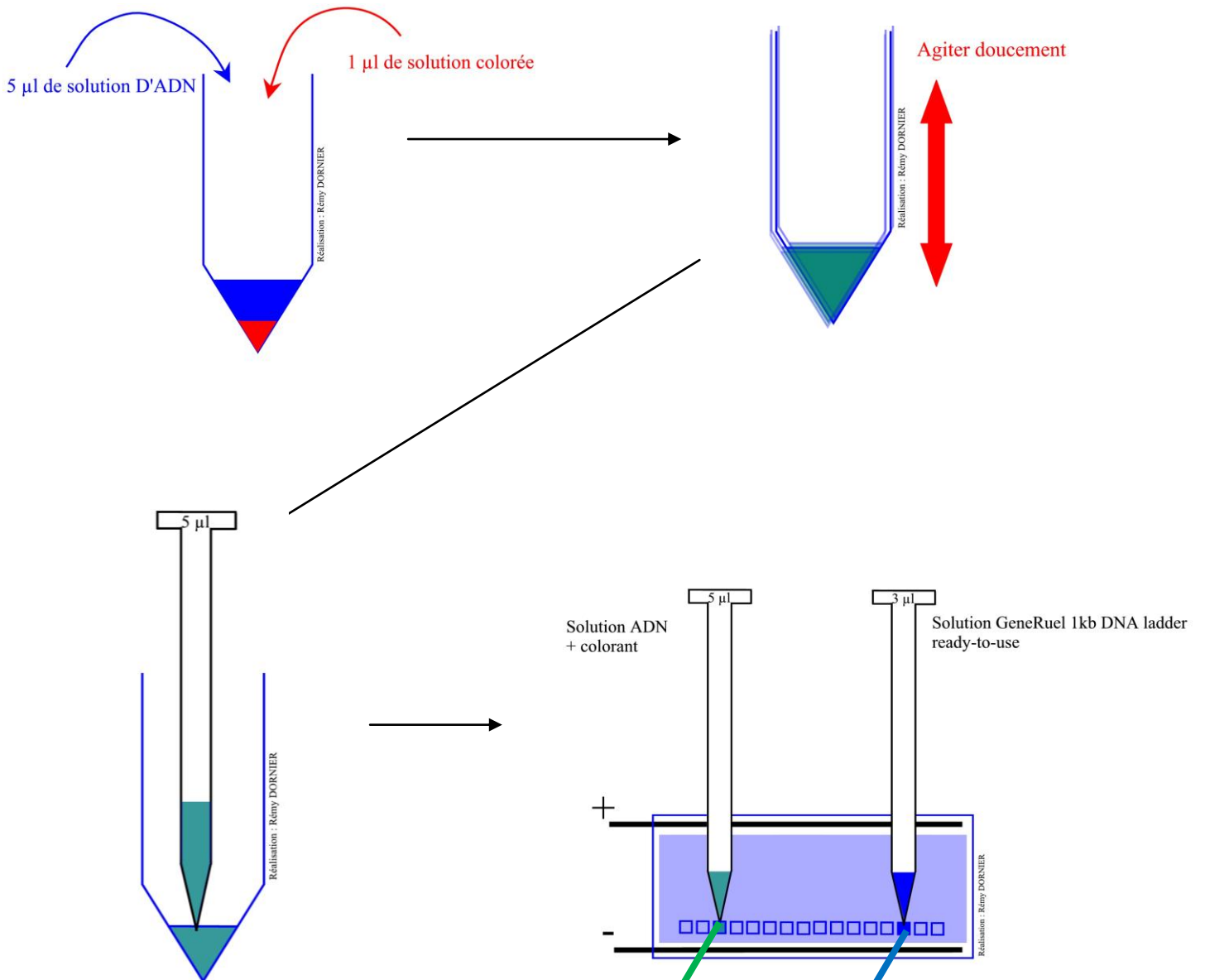


Il se peut qu'aucune tâche ne soit observée lors de l'électrophorèse. Dans ce cas, cela veut pouvoir dire 2 choses : soit l'extraction de l'ADN a été déficiente et aucune molécule d'ADN ne se trouvait dans le tube PCR. Soit la PCR n'a pas fonctionné et/ou a amplifié un autre gène.

Protocole d'une électrophorèse sur système Flash Gel de Lonza.

- Préparer la cassette d'électrophorèse composée de 17 + 17 puits, répartis en 2 lignes
- Inonder les puits de la première ligne (si utilisation d'une seule des 2) avec de l'eau bi-distillée.
- Faire évacuer l'eau en penchant la cassette
- Eponger les dernières gouttes avec du papier absorbant SANS toucher les puits.
- Si utilisation d'une seule des 2 lignes, placer le masque FlashGel sous le plateau central des puits d'échantillon.
- Dans un tube PCR, prélever 5 µl de la solution d'ADN amplifiée (celle qui sort du séquenceur) et 1 µl de solution colorée « 6X DNA loading dye » (le rapport entre la quantité d'ADN et la solution colorante doit toujours être de 5).
- Mélanger gentiment la préparation pour ne pas casser l'ADN
- Prélever 5 µl de la solution préparée et la déposer dans l'un des puits de la cassette à électrophorèse (chaque puits ayant une capacité maximale de 5 µl)
- Prélever 3 µl de la solution de « GeneRuler 1kb DNA ladder ready-to-use » et la déposer dans un autre puits de la cassette à l'électrophorèse.
- Connecter les électrodes sur leur support
- Brancher l'appareil
- Le régler sur 150 V
- Au bout de 10 minutes, observer le résultat à l'aide de la lampe UV incrustée dans l'appareil.

Schémas des prélèvements à réalisés lors d'une électrophorèse



Concernant le *populus nigra*, 5 gènes vont être intéressants dans notre étude dont un particulier : le gène CAD. Après électrophorèse, la présence de ce gène pourra être vérifiée par une tâche aux alentours de 923 pb (paires de base). Voici le résultat de 14 électrophorèses du même gène démultiplié (le gène CAD) :



Sur cette électrophorèse, nous remarquons, à chaque extrémité, la présence d'un marqueur de taille, qui correspond à la solution « GeneRule 1 kb DNA ladder ready-to-use ». Ces marqueurs nous permettent de visualiser les différentes hauteurs des tâches correspondant aux différents gènes. Ici, nous remarquons que 10 solutions d'ADN de *populus nigra* possèdent bien le gène CAD à 923 pb. 2 témoins sont négatifs (problèmes éventuels lors de l'extraction) et 3 sont très peu intenses.

Ces 10 échantillons d'ADN positifs seront envoyés, en quantité égale à 25 µl, au génoscope, qui va valider ou non l'électrophorèse avant d'envoyer les échantillons à Paris, où ils seront décodés pour pouvoir être exploités.

Comment les échantillons sont-ils décodés ?

Le décodage des échantillons d'ADN est appelé séquençage. Il existe diverses techniques de séquençage de l'ADN dont les plus utilisées encore aujourd'hui sont la méthode de Sanger et les méthodes de nouvelle génération.

La méthode de Sanger

Point histoire : Frederick Sanger (1918-2013) est un biochimiste anglais qui a, entre autres choses, mis au point le séquençage de l'ADN pour permettre sa lecture. En 1977, la méthode de Sanger a été pour la première fois utilisée pour séquencer le génome complet d'une bactérie. Cette découverte lui a valu une médaille Copley.

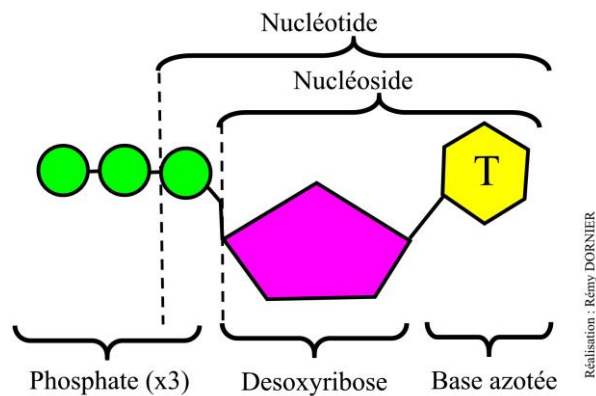
Anecdote : F. Sanger a également reçu 2 prix Nobel de chimie (1958 / 1980).

Pour pouvoir séquencer avec cette méthode, il faut que l'échantillon à séquencer soit présent en de nombreuses copies (voir ci-dessus pour la PCR). A la fin de la PCR, nous avons des milliards de copies de l'échantillon d'ADN double brin (ici, un gène, par exemple). Cette méthode de séquençage consiste à prendre un des 2 brins d'ADN et à ajouter le nucléotide complémentaire sous certaines conditions de manière à savoir quel nucléotide a été incorporé pour reconstituer la séquence entière. Comment faire ?

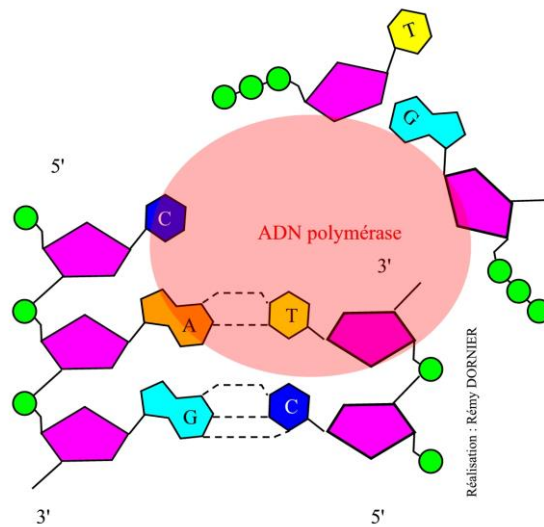
Tout d'abord, il faut savoir que l'ADN polymérase ne reconnaît pas les nucléotides tels qu'on les connaît mais elle reconnaît des nucléosides triphosphates (NTP) (ou desoxyribonucléotides triphosphates). Leur structure est simple : nucléotide + 2 phosphates. L'ADN polymérase incorpore ces nucléosides triphosphates complémentaires au nucléotide et lorsque les liaisons (hydrogène et covalentes) se forment, les 2 phosphates « en trop » sont éliminés en une molécule appelée pyrophosphate pour former un nucléotide + libération de H^+

Remarque : ceci est aussi valable pour la réplication de l'ADN dans nos cellules ainsi que pour les cycles de PCR.

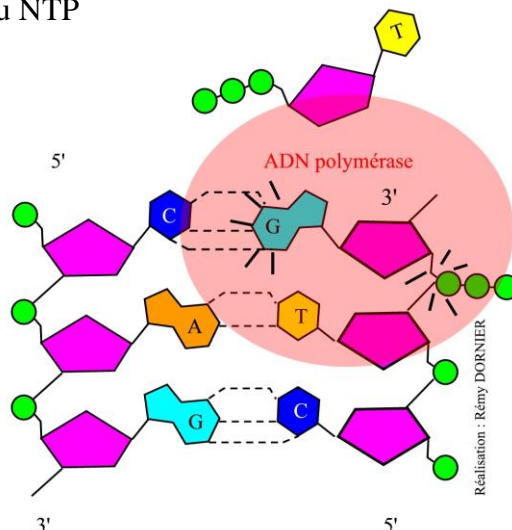
Structure d'un nucléoside triphosphate



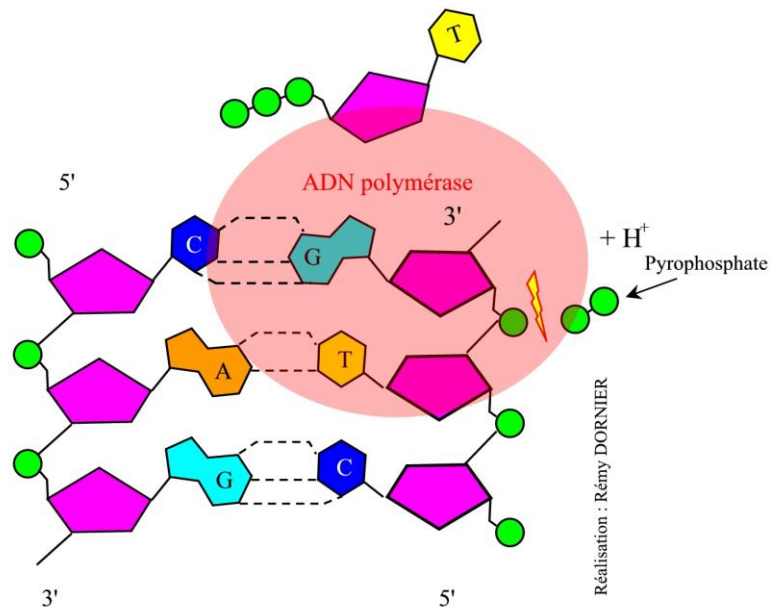
Etape 1 : reconnaissance des NTP par l'ADN polymérase



Etape 2 : incorporation du NTP



Etape 3 : rupture des 2 phosphates (= pyrophosphate) + libération d'un ion H^+ .

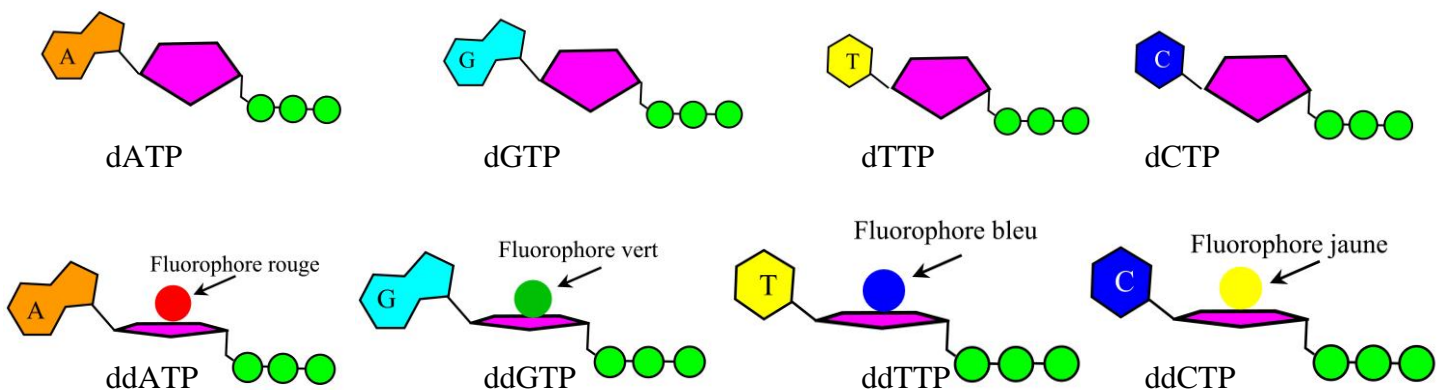


Maintenant, nous allons placer, dans un tube, les **copies du gène à séquencer**, l'**ADN polymérase** et les nucléosides triphosphates (**dGTP, dTTP, dATP, dCTP**). Pour que le séquençage fonctionne, il faut encore ajouter 2 autres réactifs : une amorce et des terminateurs irréversibles.

Cette amorce correspond à une petite séquence (20 nucléotides) du gène à séquencer (autrement dit, il faut connaître une petite partie du gène que l'on souhaite séquencer). Pour pouvoir sélectionner un seul des 2 brins d'ADN, nous allons n'introduire dans le tube **que l'amorce « principale », sans l'amorce complémentaire**.

Enfin, les terminateurs, aussi appelée didesoxyribonucléotides triphosphates. Ce sont aussi des nucléosides triphosphates mais avec la particularité de stopper la synthèse du brin d'ADN complémentaire à celui du gène. Sa structure empêche la liaison d'un nouveau nucléoside triphosphate. De ce fait, l'ADN polymérase cesse de fonctionner et la synthèse s'arrête. De plus, on ajoute sur ces terminateurs, des molécules fluorescentes (à chaque terminateur (**ddGTP, ddTTP, ddATP, ddCTP**) est associée une couleur différente). Les terminateurs sont introduits en une très faible proportion par rapport aux nucléosides triphosphates normaux (1 % de terminateurs par rapport à l'ensemble des nucléosides triphosphates).

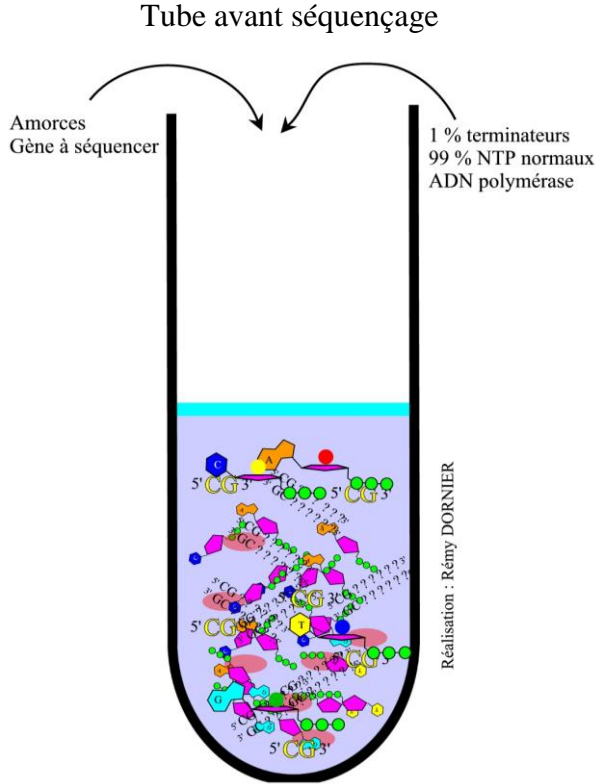
(ATTENTION : les amorces utilisées sont très simplistes, elles permettent uniquement d'améliorer la compréhension).



ADN polymérase

5' CG ? ? ? ? ? ? 3'
 3' GC ? ? ? ? ? ? 5'
 gène à séquencer

5' CG 3'
 amorce



Que se passe-t-il une fois que tout est mélangé ?

Etape 1 : on chauffe, comme pour la PCR, à 94°C pour dénaturer les molécules d'ADN.

Etape 1 : Dénaturation

5' CG ? ? ? ? ? ? 3'
 3' GC ? ? ? ? ? ? 5'

Etape 2 : on baisse la température pour que les amorces se fixent.

Etape 2 : Hybridation

5' CG ? ? ? ? ? ? 3'
 5' CG 3'
 3' GC ? ? ? ? ? ? 5'

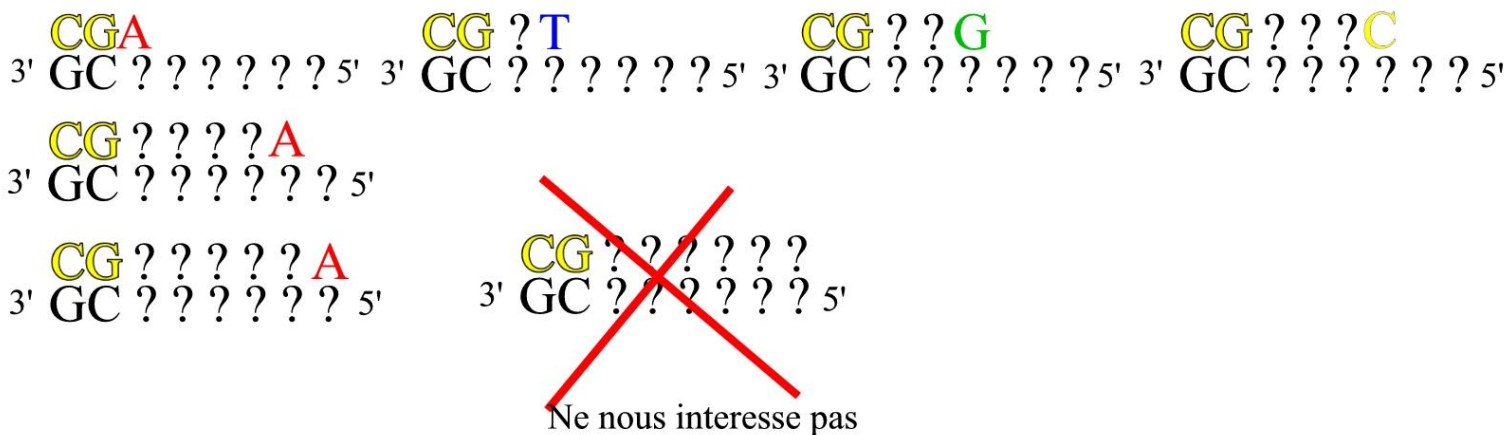
L'ADN polymérase intervient alors et incorpore, au hasard, le nucléoside triphosphate complémentaire. Lors de la synthèse, un terminateur peut être incorporé, ce qui va avoir pour effet de stopper la synthèse de ce brin. Comme le gène est présent en milliards de copies, l'incorporation d'un terminateur va pouvoir se faire au niveau de chaque nucléotide. Une fois que toutes les synthèses ont eu lieu, notre tube contient des fragments d'ADN de différente longueur et de différente couleur (car chaque fragment se termine par un terminateur qui est coloré).

Dans cet exemple, les terminateurs seront marqués par une lettre de la couleur de leur fluorescence.

Remarque : il est tout à fait possible que, sur certain brin, aucun terminateur ne soit incorporé (puisque cela se fait au hasard). Mais, au vue du nombre de copie du gène, il y a une probabilité plus ou moins importante pour que l'on ait au moins un représentant de chaque.

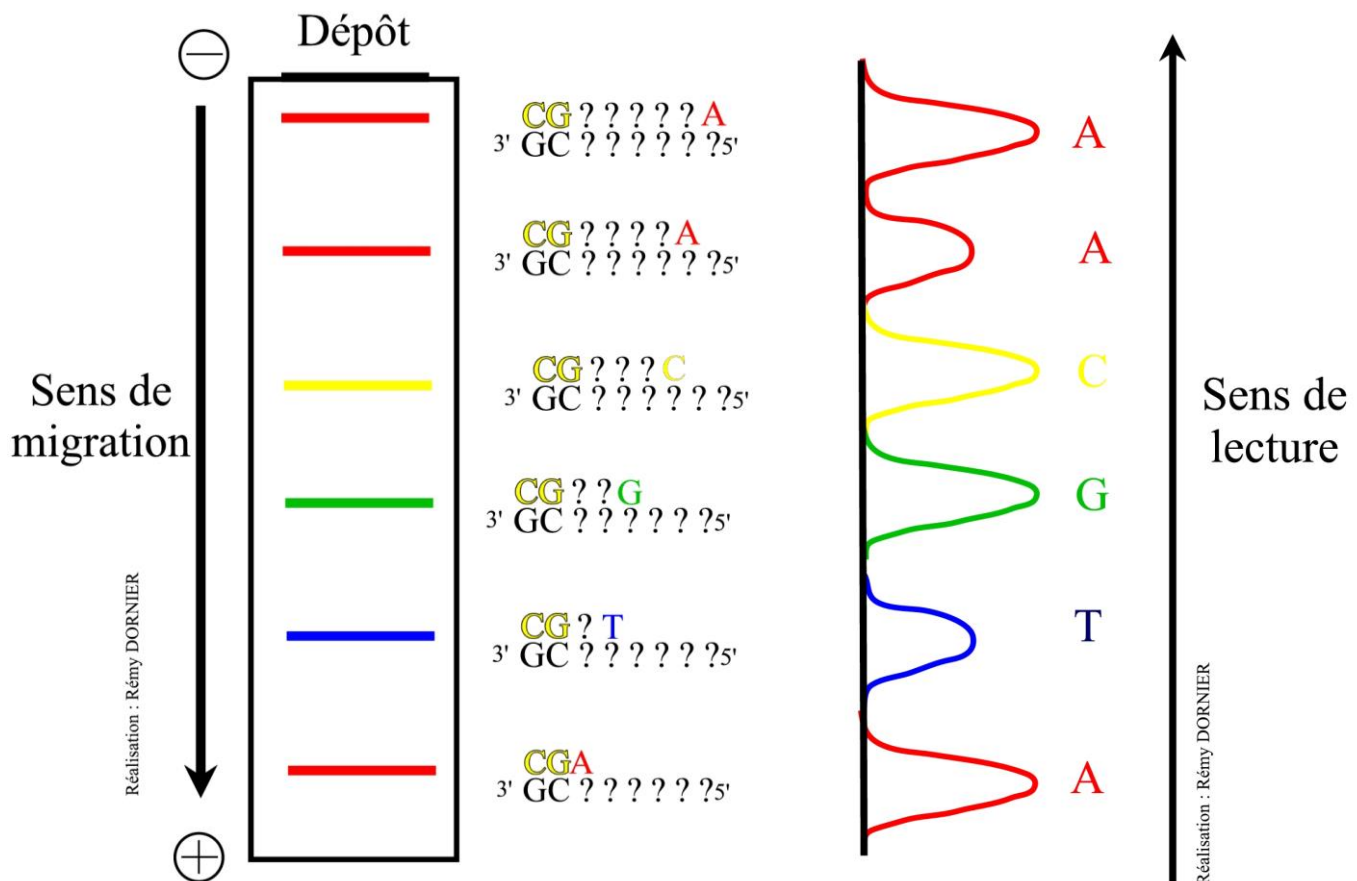
Etape 3 : Elongation

Différents résultats possibles



Maintenant que nous avons nos produits, il ne nous reste plus qu'à les analyser. Pour cela, nous allons réaliser une électrophorèse. On place dans un puits le contenu de notre tube et on remarque au final des taches de couleurs différentes qui se succèdent, à intervalle régulier. Connaissant le principe de l'électrophorèse, on en déduit que les fragments les plus éloignés du lieu de dépôt sont les plus légers et ceux les plus proches sont les plus lourds. De plus, nous connaissons les couleurs de chaque terminateur ainsi que la séquence de l'amorce. Donc, par lecture de bas en haut, on peut retrouver la séquence du gène. Cette dernière opération est en réalité réalisée avec un laser qui analyse les couleurs émises par chaque tache. Il est résulte alors un graphique donnant la couleur analysée suivant la distance au lieu de dépôt ainsi que l'intensité de la lumière émise (plus elle est intense, plus le nombre de copie de ce fragment est grand).

Remarque : dans le tube se trouve également l'ADN polymérase, les amorces en trop ainsi que le reste des nucléosides triphosphates. Même si on ne les élimine pas avant de faire l'électrophorèse, cela ne nous gêne en rien car ils ne sont pas fluorescents (même les terminateurs puisqu'il faut qu'ils soient liés pour émettre la lumière). De ce fait, ils n'interviendront pas dans l'analyse de la séquence.



Séquence complète :
 CGATGCAA
 GCTACGTT

Voici comment on a pu décrypter ce gène.

Remarque : à l'origine, la méthode de Sanger ne concevait pas de tout mélanger dans un seul tube mais de séparer les terminateurs A, T, C et G dans 4 tubes différents. On répétait 4 fois la même opération que ci-dessus avec seulement un terminateur. Pour trouver le résultat final, il fallait croiser les 4 résultats intermédiaires.

Les méthodes de « nouvelle génération »

Il existe plusieurs méthodes de séquençage dites de nouvelle génération que l'on peut classer en 2 catégories : séquençage à molécule unique et séquençage à molécule non unique.

Avant tout, il faut savoir que ces méthodes de séquençage (sauf une) ne permettent de séquencer que des séquences inférieures à 400 bp (paires de base) contrairement à la méthode de Sanger qui, elle peut séquencer plus de 1000 bp sur un seul et même fragment.

Commençons par la technique de séquençage à molécule non unique.

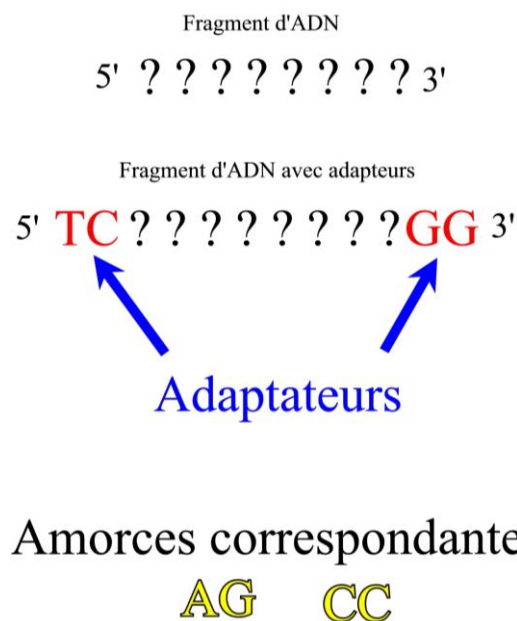
Il s'agit de la technologie Ion Torrent™. Cette technologie utilise la microfluidique en goutte. Mais avant tout, il faut couper le fragment d'ADN en morceaux d'une longueur plus ou moins identique et inférieure à 400 bp. Pour cela, on utilise des ultra-sons. En fonction de leur intensité et de la durée d'exposition, on peut savoir approximativement la longueur des fragments résultants. Ensuite, on crée des gouttes (généralement des gouttes d'eau) toutes identiques les unes aux autres. Dans chacune de ces gouttes, on place : une micro-bille, un des fragments d'ADN à séquencer, les amorces, l'ADN polymérase, les nucléosides triphosphates ainsi que des adaptateurs. Les adaptateurs (*adapters* en anglais) sont de courtes séquences d'ADN que l'on connaît et que l'on accroche à chaque extrémité de chaque fragment. Dans

quel but ? Tout simplement car, contrairement à la méthode de Sanger, on n'est pas toujours censé savoir une partie du gène à séquencer (à fortiori ici puisque que l'on fragment le gène à séquencer en des fragments plus petits et dont on ne connaît ni le début ni la fin). Le fait d'ajouter des adaptateurs à chaque extrémité rend, certes, le fragment plus long mais cela nous assure que les amorces, complémentaires aux adaptateurs, vont pouvoir se lier au bon endroit et séquencer l'ensemble du fragment.

Attention : adaptateurs ≠ amorces

Attention : les adaptateurs et amorces utilisés sont très simplistes puisque normalement longs d'une vingtaine de nucléotides. Ils ne sont utilisés que pour améliorer la compréhension.

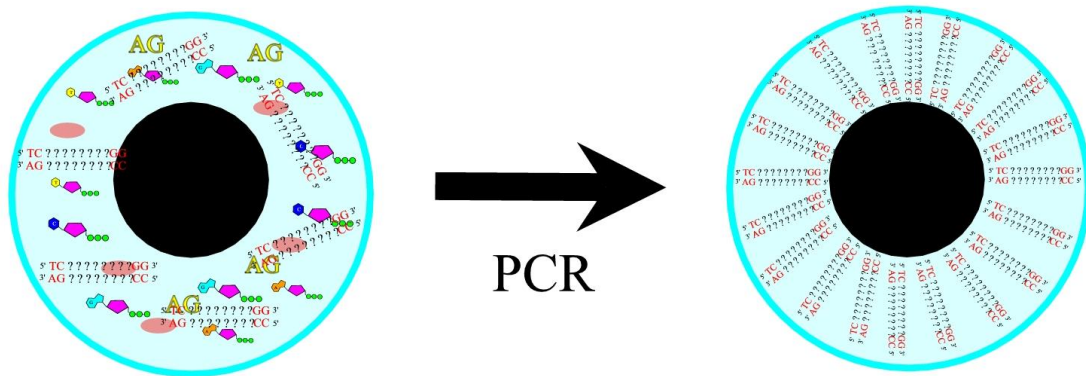
Remarque : dans chaque bille sont incorporés les mêmes adaptateurs.



Une fois tous les ingrédients mis dans la goutte, on réalise une PCR à l'intérieur de chaque goutte pour amplifier le fragment. Ceci fait, les millions de fragments vont s'accrocher à la bille. Nous allons maintenant pouvoir travailler avec la bille seulement. On incorpore maintenant une seule des 2 amorces dans chaque bille (rappelons que les amorces sont le complémentaire des adaptateurs qui sont tous identiques). De cette façon, on ne va synthétiser qu'un seul des 2 brins, ce qui nous permettra de connaître le brin d'ADN. On va placer au hasard chaque bille dans un compartiment unique, situé sur une plaque. Chaque compartiment, de quelques centaines de μm de diamètre, est relié à un réseau de transistors sensibles au pH. Pourquoi ? Parce que nous savons que, lors de l'incorporation d'un nucléoside triphosphate, un ion H^+ est libéré. Cet ion va changer localement le pH de la solution et cette variation va pouvoir être enregistrée par les transistors. En connaissant cela, le séquençage devient facile : on incorpore le même NTP dans chaque compartiment et on regarde dans quel compartiment le pH varie. Puis, on lave chaque compartiment et on recommence avec le NTP suivant et ainsi de suite... en alternant à chaque fois le NTP. À la fin, et pour chaque compartiment, on récapitule, dans l'ordre, pour quel nucléotide il y a eu variation de pH et on en déduit la séquence d'ADN. Une fois que tous les fragments sont séquencés, on utilise un logiciel bio-informatique pour aligner les fragments qui, rappelons-nous, ont été mis au hasard dans les compartiments, et on trouve enfin la séquence du gène.

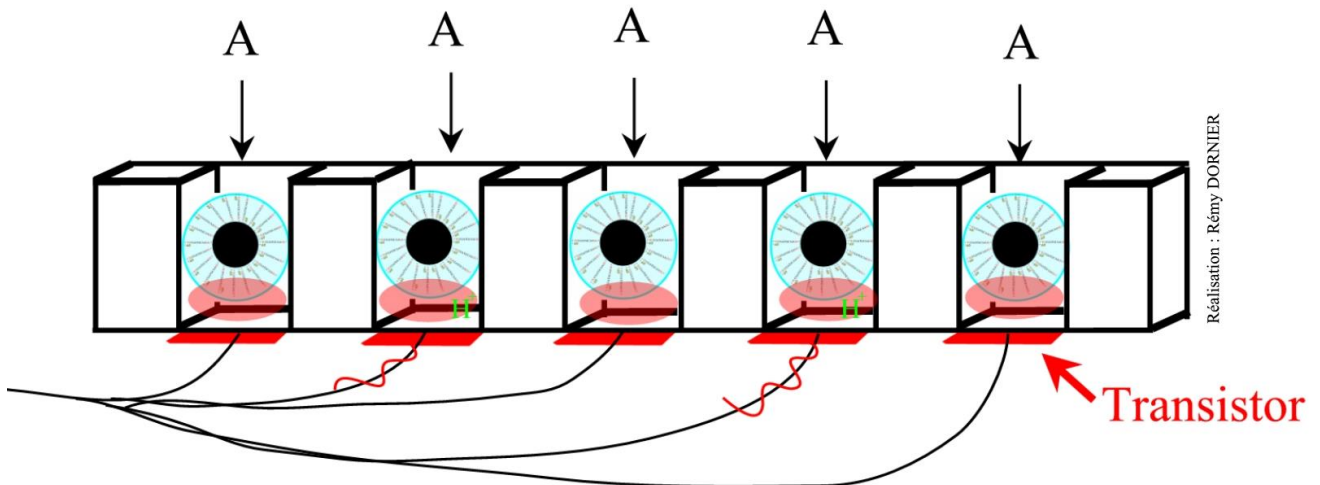
Remarque : il est possible et même certain que certaines séquences contiennent plusieurs nucléotides identiques à la suite. Dans ce cas, les complémentaires seront incorporés en même temps. Mais cela ne pose aucun problème puisqu'il y aura d'autant plus d'ion H^+ libérés et donc une variation de pH proportionnelle.

Schéma de la micro-bille avant et après PCR



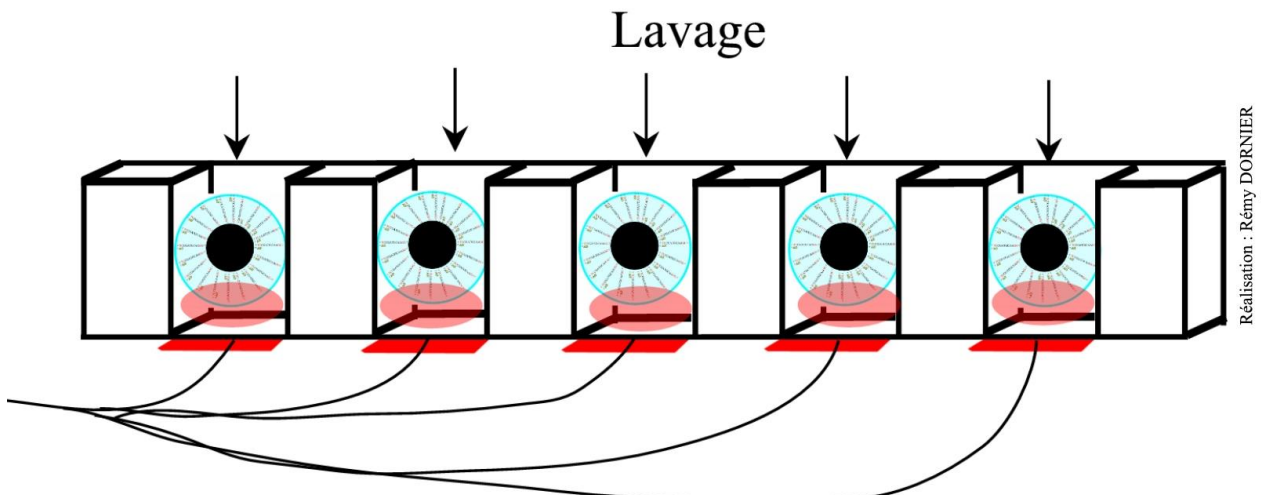
Réalisation : Rémy DORNIER

Etape 1 : incorporation de même nucléotide dans tous les puits



Réalisation : Rémy DORNIER

Etape 2 : lavage des micro-puits



Réalisation : Rémy DORNIER

Etape 3 : incorporation d'un autre nucléotide dans chacun des puits

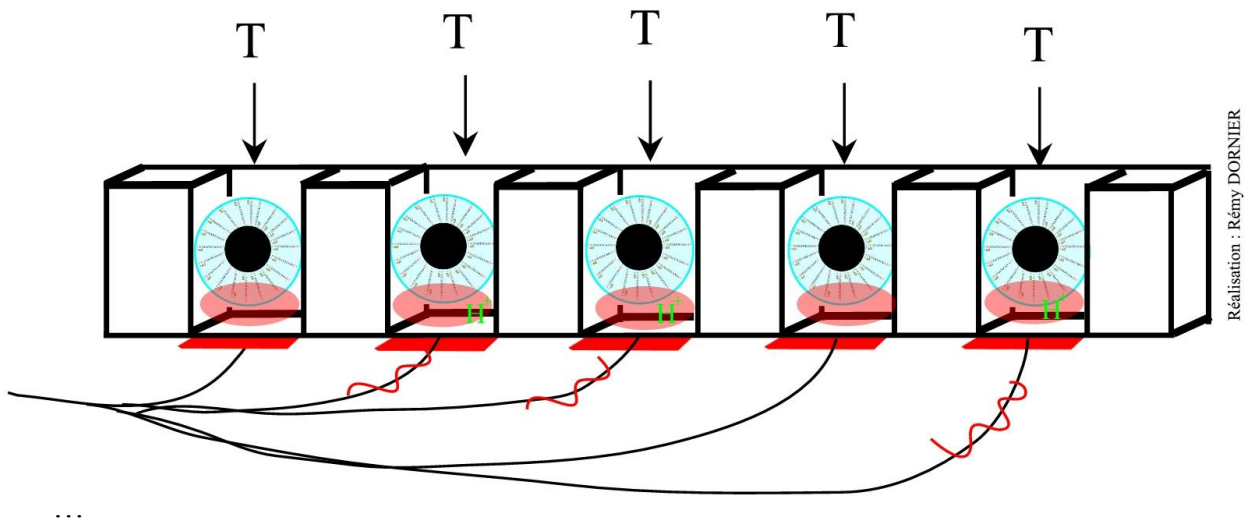


Tableau représentant les puits avec une variation de pH pour un nucléotide donné

ordre d'apparition des nucléotides → Fragment n° : ↓	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	...
1			*	*			*		*	*	*		
2	*	*	*	*		*	**		*	*			
3		*	*	*	*	***	*		**		*	*	
...													

* : variation unitaire de pH

On peut alors reconstituer la séquence de nucléotide de chaque puits :

Puits 1 : CGCATC...

Puits 2 : ATCGTCCAT...

Puits 3 : TCGATTCAACG...

Passons cette fois-ci aux méthodes de séquençage à molécule unique. Nous en distinguerons 2 : Pacific bioscience™ et Oxford nanopore.

Commençons par Pacific bioscience™.

Le séquençage se fait ici dans des trous de taille nanométrique, percés dans une plaque métallique. Cette plaque de métal est elle-même posée sur une plaque de verre. Dans chaque trou, on fixe une ADN polymérase sur le verre (grâce à des liaisons électrostatiques) et on introduit un **SEUL** fragment d'ADN par trou. On aura au préalable fixé des adaptateurs sur l'ADN et introduit les amorces correspondantes (*voir ci-dessus pour les adaptateurs*). Tout est donc prêt pour le séquençage du brin complémentaire au fragment d'ADN ; il ne manque plus que les nucléosides triphosphates. Ces-derniers sont d'une nature un peu différente des NTP normaux. En effet, ce sont des terminateurs mais cette fois-ci réversibles (et non irréversibles comme dans la méthode de Sanger). Cela veut dire qu'ils sont porteurs d'un groupe qui empêche, certes, la synthèse de l'ADN mais qui peut être enlevé, ce qui aura pour effet de continuer la synthèse. On y a également rajouté une molécule fluorescente, différente

pour chaque NTP, qui sera, elle aussi, éliminée en même temps que le groupe inhibiteur de la synthèse. On introduit donc les terminateurs réversibles dans les trous (on ne les dépose pas un par un ; on en met une certaine quantité sur la plaque métallique pour qu'ils se répandent dans les trous). Que va-t-il se passer ? Lors de l'incorporation d'un terminateur, la synthèse s'arrête pendant quelques millisecondes avant de reprendre. La molécule fluorescente est alors activée pendant ces quelques millisecondes. La lumière émise est alors analysée par un capteur situé sous la plaque de verre, sous chaque trou. De cette façon, en analysant la succession des couleurs, on peut retrouver la séquence complémentaire du fragment et remonter aux nucléotides formant l'ADN introduit dans chacun des trous.

Remarque : Avec cette méthode, on peut séquencer en moyenne 10 000 à 15 000 bp en une seule fois.

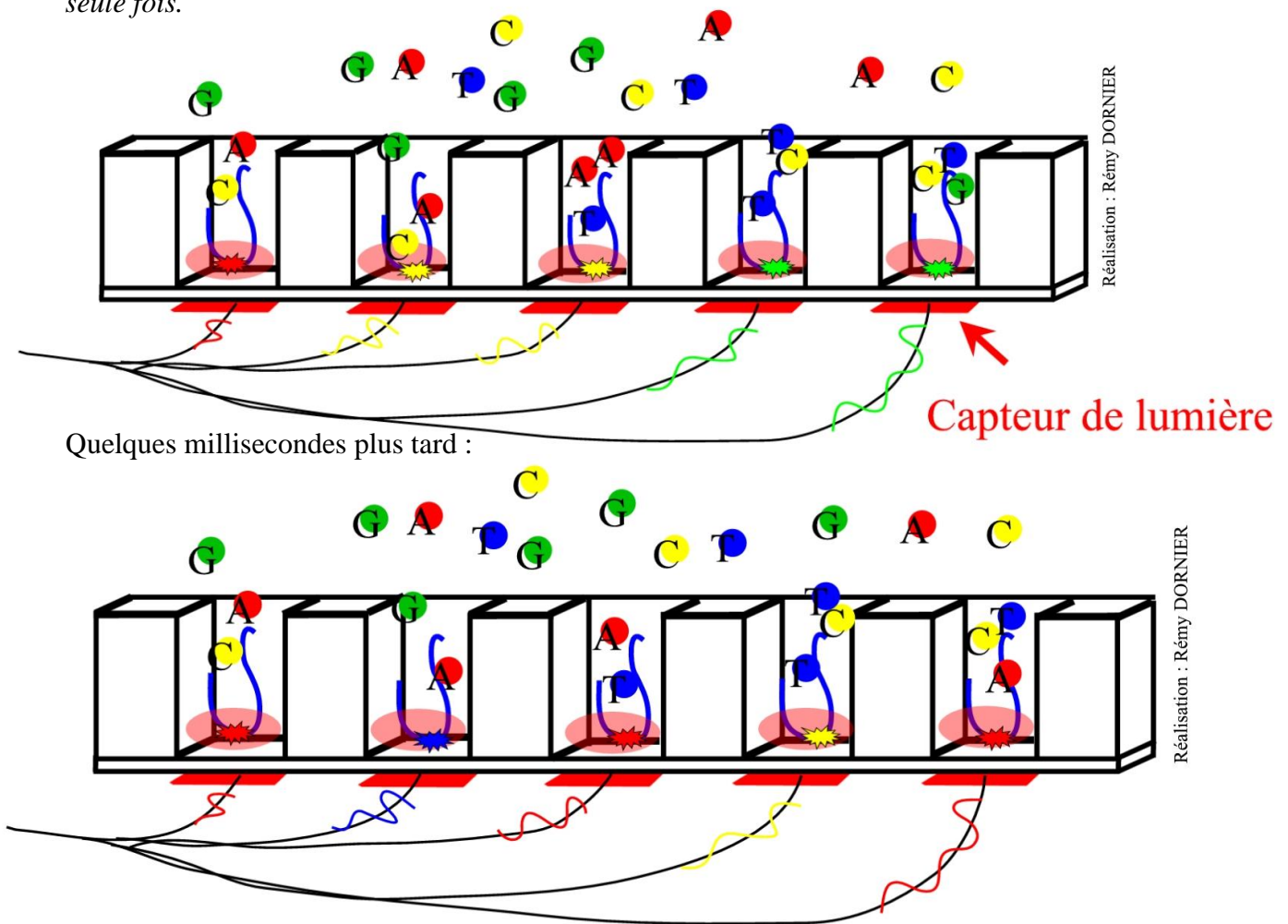


Tableau représentant la succession de couleurs dans chaque trou

Couleurs→ Fragment n° : ↓	Rouge (A)	Bleu (T)	Jaune (C)	Vert (G)	Rouge (A)	Bleu (T)	Jaune (C)	Vert (G)	Rouge (A)	Bleu (T)	Jaune (C)	Vert (G)	...
1	*				*						*		
2			*			*			*				
3			*		*						*		
...													

Trou 1 : AAC...
 Trou 2 : CTA...
 Trou 3 : CAC...

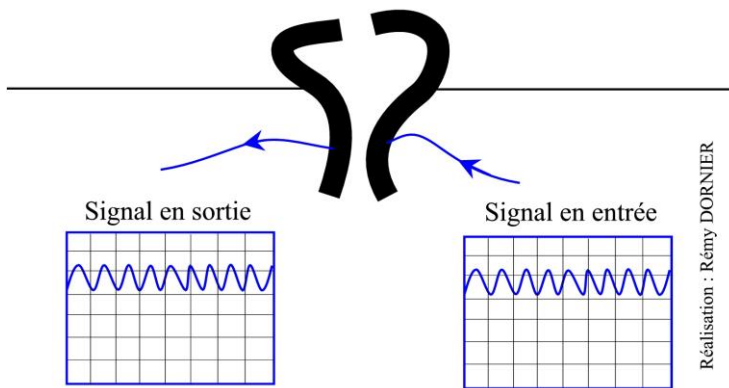
Voici comment on arrive à séquencer des molécules d'ADN.

La méthode suivante est encore plus surprenante. Oxford nanopore utilise également une seule molécule d'ADN mais cette fois-ci, il n'est pas question d'ADN polymérase ni d'amorces et encore moins de molécules fluorescentes. Les chercheurs ont créé un nano-pore, c'est-à-dire un orifice de quelques nanomètres de diamètre. Ce nano-pore se comporte comme une importante résistance électrique. La molécule d'ADN, chargée négativement, est alors « aspirée » par le nano-pore et passe à travers. Or, chaque nucléotide a une polarité légèrement différente et une forme différente. Ce qui veut dire que, lorsque chacun d'eux va passer dans le nano-pore, ils vont chacun modifier de manière unique la résistance électrique interne du nano-pore. Cela va alors induire une déformation du signal électrique en sortie du nano-pore. Cette modification va alors être enregistrée par un capteur adéquat et va être caractéristique d'un nucléotide donné. En analysant le signal électrique à la sortie du nano-pore, on peut retrouver les différentes modifications de la résistance et ainsi reconstituer la chaîne de nucléotides de la molécule d'ADN.

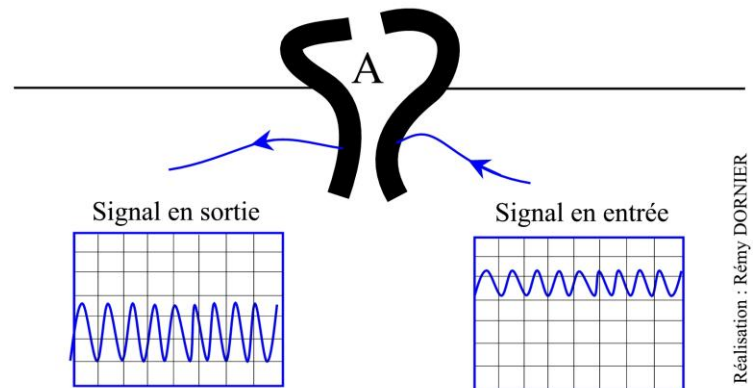
Remarque : avec cette méthode, on peut séquencer jusqu'à 500 kb.

Déformation du signal électrique en fonction du nucléotide

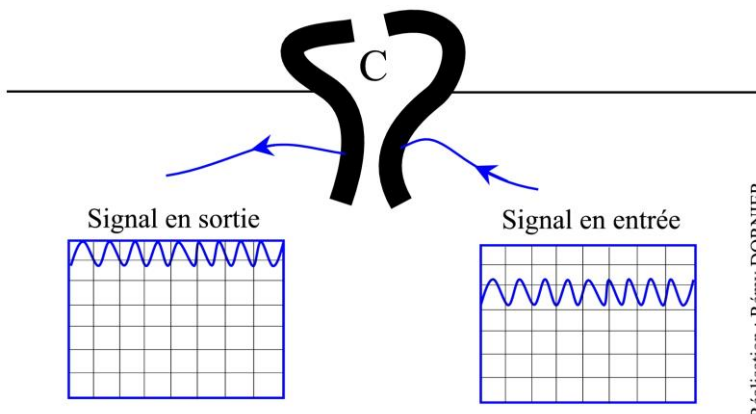
Sans passage dans le nano-pore



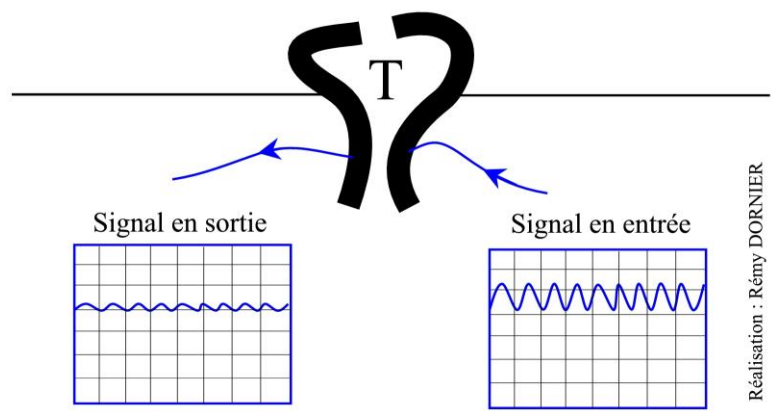
Passage de l'adénine



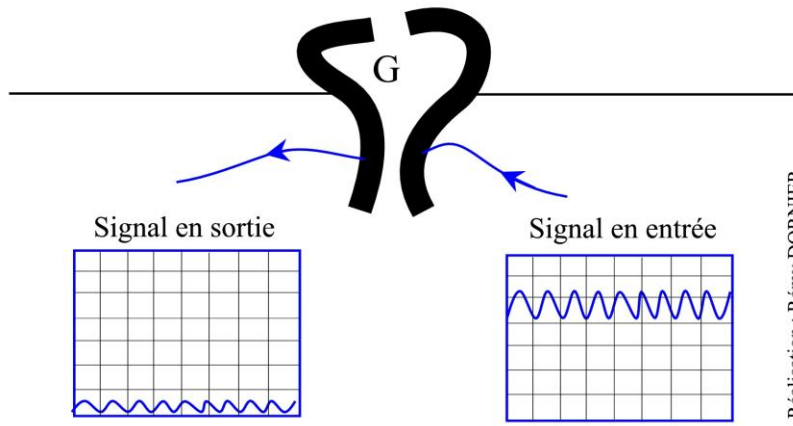
Passage de la cytosine



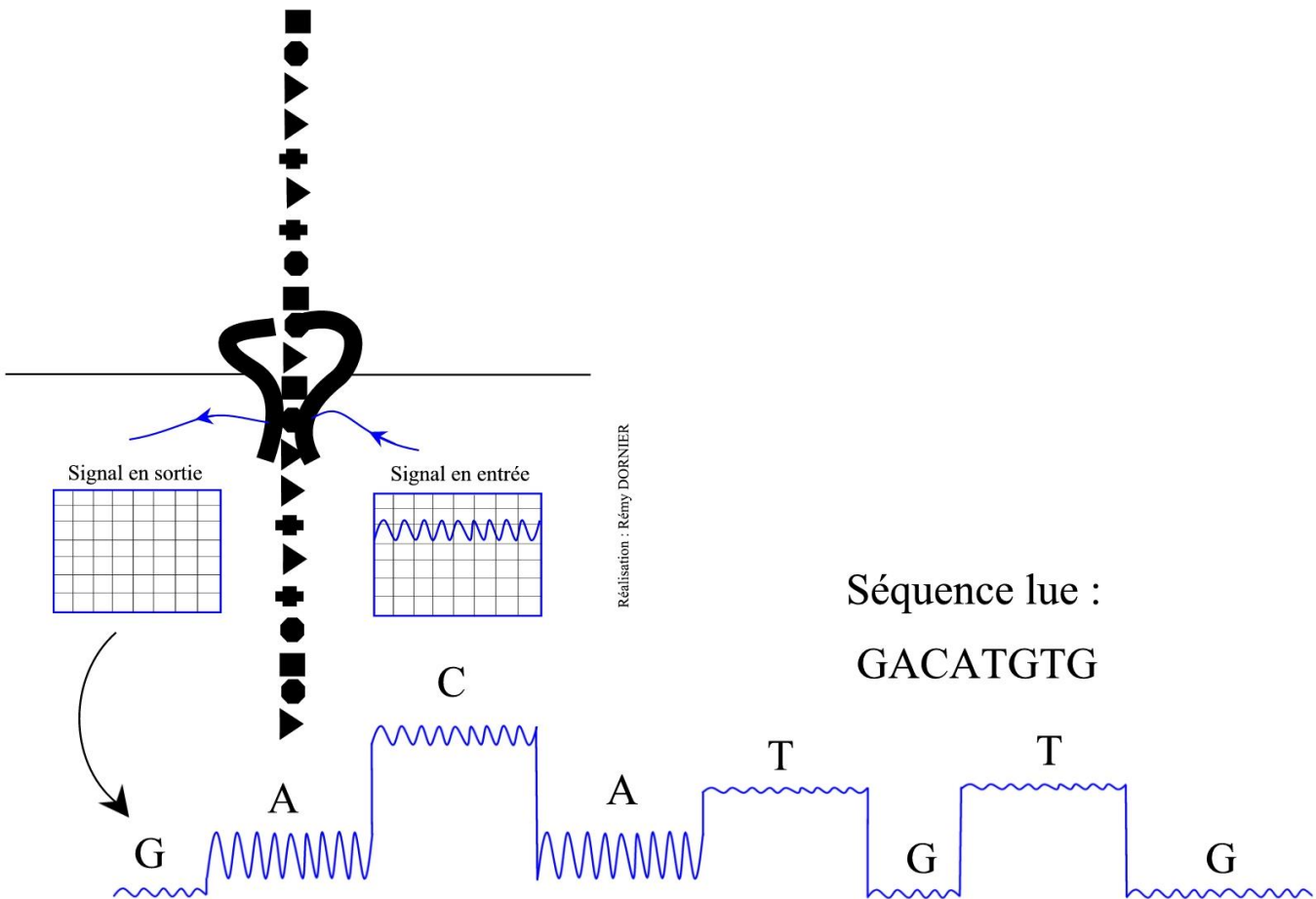
Passage de la thymine



Passage de la guanine



Avec une molécule d'ADN simple brin



Remarque : le symbole placé derrière chaque nucléotide fait simplement référence à la configuration spatiale différente de chaque nucléotide ; il n'a qu'un but indicatif, pour améliorer la compréhension.

Pour les curieux en génétique :

<https://www.dnalc.org/resources/animations/>

<https://www.dnalc.org/resources/>

<https://www.dnalc.org/resources/3d/>

...

It's in english, but it's very interesting !

Un peu de vocabulaire pour mieux comprendre le site :

Primers = Amorces

Adapters = adaptateurs

DNA= ADN

RNA = ARN

mRNA =ARNm

Cell = cellule

Sequencing = séquençage

Splicing = épissage

Triplet code = code génétique

Translation = traduction

Helix = hélice

Stem cells = cellules souches

Array \approx arrangement de quelque chose (comme casier ou tableau de quelque chose)

Sickle cells = cellule en forme de faucille

Disease = maladie

Pathways = voie d'accès

Protein = protéine

Chip = puce (électronique)

DORNIER Rémy

Etudiant EPFL